



**ANALISIS PROTEIN DEFENSIN DARI BIJI JINTEN HITAM
(*Nigella sativa* L.) PADA MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIBERI BIJI
JINTEN HITAM MELALUI TEKNIK SDS-PAGE**

***THE ANALYSIS OF DEFENSIN FROM BLACK CUMIN SEED (*Nigella sativa* L.)
IN MICE (*Mus musculus*) TREATED BY BLACK CUMIN SEED
USING SDS-PAGE TECHNIQUE***

Rr. Bhintarti Suryohastari*

Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta

**Corresponding author: bhintarti.hastari@uin.jkt.ac.id*

Diterima: 02 Februari 2016. Direvisi: 22 Februari 2016. Disetujui: 25 Maret 2016.

Abstrak

Ns-D1/Ns-D merupakan protein defensin dalam biji jinten hitam (*Nigella sativa*) dengan berat molekul (BM) 5,4763 kDa/5,4924 kDa. Penelitian ini bertujuan menganalisis defensin dari ekstrak protein biji *N. sativa* dan mencit (*Mus musculus*) yang diberi ekstrak protein biji *N. sativa*. *M. musculus* dibagi menjadi kelompok K (kontrol) yang tidak diberi ekstrak protein biji *N. sativa*. Kelompok D1, D2 dan D3 diberi ekstrak protein biji *N. sativa* dalam dosis rendah (0,35 mg/bb), dosis sedang (0,7 mg/bb) dan dosis tinggi (1,4 mg/bb) selama 7 hari dan pada hari ke-8 dilakukan pengambilan darah. Analisis protein defensin dilakukan melalui teknik SDS-PAGE pada gel poliakrilamid 17% terhadap sampel darah K, D1, D2, D3 dan sampel ekstrak protein biji *N. sativa* (T). Hasil menunjukkan pada sampel T terdapat pita protein BM 3,4–10 kDa, pada sampel K terdapat pita protein dengan BM 6,1486 kDa dan pada sampel D1, D2 dan D3 terdapat pita protein dengan BM 5,5973 kDa. Munculnya pita protein dengan BM <6 kDa pada D1, D2 dan D3 menunjukkan adanya Ns-D1/Ns-D2 pada *M. musculus* yang diberikan ekstrak protein biji *N. sativa*.

Kata kunci: Defensin; Jinten hitam (*Nigella sativa*); Mencit (*Mus musculus*); SDS-PAGE

Abstract

*Ns-D1/Ns-D2 are defensins protein in the seed of black cumin (*Nigella sativa*) with molecular masses 5.4763 kDa/5.4924 kDa. This study aimed to analyze the profile of defensin from black cumin seed extract and its presence in blood of mice (*Mus musculus*) treated with black cumin seed. The mice were divided into 4 groups (K, D1, D2, D3) and each group consisted of 5 mice. K was a group of controlled mice, which was not treated by black cumin seed protein extract, while the D1, D2, and D3 were groups of mice which were treated by black cumin seed protein extract with a low dose (0.35 mg/bw), medium dose (0.7 mg/bw) and high dose (1.4 mg/bw). The treatments were conducted for 7 days. Blood of the treated mice were collected at 8th day. The defensin profiles were analyzed by SDS-PAGE. The results showed that protein bands within 3.4 kDa–10 kDa were found from black cumin seed protein extract (T), at 5.5973 kDa from all treatments and at 6.1486 kDa in control (K1) was detected. The appearance of protein bands lowered than 6 kDa in T, D1, D2 and D3 showed the possibility of the presence of black cumin seed protein extract in the mice blood.*

Keywords: Black cumin seed (*Nigella sativa*); Defensins; Mice (*Mus musculus*); SDS-PAGE

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniah.v9i1.3251>

PENDAHULUAN

Penelitian terhadap biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang oleh masyarakat luas dikenal sebagai *habbatus sauda* telah membuktikan kemampuannya untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Aspek farmakologis yang telah dieksplorasi mencakup kemampuan *N. sativa* sebagai antidiabetes, anti-kanker, imunomodulator, analgesik, antimikroba, antiinflamasi, spasmolitik, bronkodilator, mencegah gangguan fungsi hati, mencegah gangguan fungsi ginjal, mencegah gangguan lambung, sebagai antioksidan, dan lain-lain. Karena kemampuannya dalam menyembuhkan penyakit, maka *N. sativa* mendapat peringkat teratas di antara obat-obatan herbal (Ahmad, 2013). Dalam literatur Islam, *N. sativa* direkomendasikan untuk digunakan secara rutin dalam *Tibb-e-Nabawi* (pengobatan cara Nabi), sebagaimana hadits yang diriwayatkan Bukhari (Bukhari-volume 007, Buku 071, Nomor Hadits 592), “Ada penyembuhan dalam *habbatus sauda* untuk semua penyakit, kecuali kematian” (Gray, 2010).

Protein yang terkandung dalam biji *N. sativa* adalah sebesar 22,7%, dengan asam amino yang meliputi albumin, globulin, lisin, leusin, isoleusin, valin, glisin, alanin, fenilalanin, arginin, asparagin, sistein, asam glutamat, asam aspartat, prolin, serin, treonin, triptopan dan tirosin. Kandungan mineral seperti Fe, Na, Cu, Zn, P, dan Ca. Selain itu, *N. sativa* juga mengandung vitamin seperti asam askorbat, thiamin, niasin, piridoksin, asam folat dan gizi (Gilani *et al.*, 2004). Pemeriksaan oleh Sucofindo pada tahun 2011 (pers.com.) terhadap komponen metabolit primer non-oil yang terkandung dalam biji *N. sativa* menunjukkan bahwa kandungan protein dan karbohidrat dalam biji *N. sativa* masing-masing berkisar 22,7% dan 33,9%; sedangkan pada limbah hasil perasan minyak dari biji *N. sativa* masih terkandung protein 18,3% dan karbohidrat sebanyak 16,7%. Menurut Haq *et al.*, (1999), ekstrak protein pada *N. sativa* memiliki potensi yang besar sebagai zat yang berperan dalam memodulasi respon kekebalan tubuh. Salah satu zat tersebut adalah satu kelas peptida dari tanaman yang disebut defensin. Pada tanaman, defensin memiliki ukuran kecil

yang terdiri dari 45 sampai dengan 54 rangkaian asam amino, dengan peptida yang kaya akan sistein dan terdapat pada seluruh Kingdom Plantae (Almeida *et al.*, 2002).

Purifikasi defensin dari biji *N. sativa* dengan menggunakan suatu metode yang dikenal sebagai *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of light-mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) dan fraksinasi defensin dari *N. sativa* menggunakan metode *Reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC) menghasilkan dua peptida yang diberi nama Ns-D1 dan Ns-D2, masing-masing memiliki berat molekul (BM) 5,4763 kDa dan 5,4924 kDa (Rogozhin *et al.*, 2011). Selain teknik di atas, salah satu teknik lain yang dapat digunakan untuk melihat profil protein dan menentukan BM suatu protein adalah menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Stryer, 1995). Metode gel satu dimensi umumnya menggunakan sodium dodesil sulfat (SDS) yang diperankan untuk solubilisasi, denaturasi dan memberikan muatan negatif pada suatu protein (Coligan, 1996). Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lain atau dari molekul lain berdasarkan ukuran, kelarutan, muatan dan afinitas ikatan. Pemisahan protein merupakan tahap yang harus dilakukan untuk mempelajari karakter dan fungsi protein (Nelson, 2004). Berbagai jenis protein pada suatu sampel akan terpisah-pisah pada gel poliakrilamid yang tergantung pada mobilitasnya, dengan demikian pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein yang disebut sebagai pita protein yang akan memisah berdasar ukuran BM protein (Fatchiyah *et al.*, 2011). Pemisahan protein pada serum dapat dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforesis SDS-PAGE (Hames, 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan defensin (Ns-D1/Ns-D2) pada mencit (*M. musculus*) yang diberi ekstrak protein biji *N. sativa* dengan melalui teknik elektroforesis SDS-PAGE. Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai tambahan referensi bagi teknologi pengembangan obat herbal yang berbasis protein.

MATERIAL DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak protein biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.), hewan uji mencit strain *Deutschland, Danken and Yoken* (DDY), pakan mencit, akuades, *Bovine Serum Albumine* (BSA), larutan A, larutan B, larutan D, marker berat molekul protein (*Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*) dari Thermo-Scientific®, larutan akrilamid/bis-akrilamid, buffer Tris-HCl, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), ammonium persulfat (APS), *tetramethylethylenediamine* (TEMED), larutan penyangga elektroforesis, larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB), metanol, mercapto-etanol, *Coomasie Brilliant Blue* (CBB)-R250 dan larutan *destaining*.

Alat-alat yang digunakan meliputi sonde, sarung tangan karet, kandang hewan uji, tempat pakan dan minum hewan uji, masker, botol sediaan uji, spektrofotometer, tabung Eppendorf, sentrifugator, mikropipet, berbagai tipe tip, gelas Beaker, lempeng (*plate*) kaca pembentuk gel vertikal Mini protean BioRad®, tanki elektroforesis, alat pemberi arus listrik (*power supply*) elektroforesis Bio-Rad, *shaker* dan alat tulis.

Persiapan Hewan Uji dan Pengambilan Darah

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *M. musculus* galur DDY, usia 2–3 bulan, jenis kelamin jantan, yang dibagi menjadi 4 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Kelompok pertama diberikan ekstrak protein biji *N. sativa* dosis rendah sebesar 0,35 mg/bb (D1), kelompok kedua diberikan ekstrak protein biji *N. sativa* dosis sedang sebesar 0,7 mg/bb (D2) dan kelompok ketiga diberikan ekstrak protein biji *N. sativa* dosis tinggi sebesar 1,4 mg/bb (D3). Kelompok *M. musculus* yang tidak diberi ekstrak protein biji *N. sativa* dan hanya diberi akuades merupakan kelompok kontrol (K). Dosis konversi pemberian ekstrak protein biji *N. sativa* ke tubuh *M. musculus* adalah sebanyak 0,5 ml/20 g berat badan hewan.

Sebelum diberikan perlakuan, dilakukan pemeriksaan terhadap kondisi fisik *M. muscu-*

lus dan aklimatisasi selama 2 minggu di dalam kandang dengan ruangan yang memiliki ventilasi udara dan pencahayaan yang baik. Pakan yang diberikan berupa pellet dan minum diberikan secara *ad libitum*. Pemberian akuades pada kelompok K dan pemberian ekstrak protein biji *N. sativa* pada kelompok D1, D2 dan D3 dilakukan secara *per-oral* selama 7 hari berturut-turut. Sonde dimasukkan melalui langit-langit mulut, kemudian masuk ke arah belakang sampai esofagus hingga masuk ke dalam lambung. Sebelum memasukkan sonde, posisi kepala *M. musculus* dipastikan dalam keadaan menengadahkan dan mulutnya terbuka sedikit, sehingga sonde dapat masuk secara lurus. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke-8 melalui pleksus *venosus* pada area *retro-orbitalis* mata *M. musculus*. Darah ditampung dalam tabung Eppendorf kemudian disentrifus 10.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Serum diambil dan disimpan dalam tabung Eppendorf baru. Penyimpanan sampel serum pada suhu -20°C dalam waktu tidak lebih dari 24 jam.

Pengukuran Kadar Protein (Metode Lowry)

Kadar protein dalam sampel ekstrak protein biji *N. sativa* diukur dengan menggunakan metode Lowry. Sebanyak 1 ml larutan A (20 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 30 mM Na-sitrat) dan 50 ml larutan B (0,1 M Na_2CO_3 dan 0,1 M NaOH) direaksikan. Campuran reaksi dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan 10 menit. Selanjutnya 0,25 ml larutan D (reagen Folin ciocalteu 1 N) ditambahkan ke dalam campuran reaksi kemudian dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan selama 30 menit. Kadar protein ditentukan dengan bantuan kurva standar BSA. Variasi konsentrasi BSA dalam kurva standar mencakup konsentrasi protein dalam sampel ekstrak protein biji *N. sativa*. Variasi serial konsentrasi yang digunakan dalam kurva standar adalah 0, 12,5, 25, 50 dan 100 µg/ml dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Penentuan kadar protein dalam suatu sampel ekstrak protein biji *N. sativa* dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik pada larutan standar.

Analisis Defensin

Keberadaan protein defensin (Ns-D1/Ns-D2) dianalisis melalui teknik pemisahan protein berdasar berat molekul, dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE metode Laemmli (Laemmli, 1970) pada gel poliakrilamid 17%. Pencetakan gel poliakrilamid dengan memposisikan bahan pembentuk gel di antara dua lempeng kaca. Larutan *resolving/separating gel* dimasukkan ke dalam ruang di antara dua lempeng kaca dengan menggunakan mikropipet sampai batas tertentu atau kurang lebih tiga perempat dari tinggi lempeng kaca. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga penuh agar permukaan gel menjadi rata. Larutan *stacking gel* disiapkan pada saat *resolving/separating gel* telah mulai memadat. Akuades yang berada di atas *resolving/separating gel* dibuang, kemudian larutan *stacking gel* dimasukkan di antara dua lempeng kaca. Bagian permukaan *stacking gel* dipasang sisir pembentuk sumuran. Lempeng kaca yang berisi gel yang telah memadat dipindahkan ke dalam tanki elektroforesis. Larutan *running buffer* dimasukkan hingga memenuhi permukaan lempeng kaca dan sisi bagian luar lempeng kaca terendam hingga kurang lebih setinggi 4 cm atau sampai merendam bagian bawah gel poliakrilamid. Sampel dengan volume 10 µl dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dicetak oleh sisir pada gel poliakrilamid. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 150 volt selama kurang lebih 1 jam. Visualisasi hasil elektroforesis SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan pewarna CBB. Pewarnaan dilakukan setelah gel poliakrilamid dilepaskan dari kedua lempeng kaca. Perendaman gel poliakrilamid hasil elektroforesis dalam larutan CBB dilakukan selama kurang lebih 24 jam di atas *shaker*. Selanjutnya gel poliakrilamid dimasukkan ke dalam wadah yang larutan *destaining* selama 15 menit di atas *shaker*. Pada gel poliakrilamid yang telah memperlihatkan adanya pita-pita profil protein, dilakukan pembilasan dengan akuades selama 15 menit di atas *shaker*. Selanjutnya dilakukan analisis terhadap profil protein yang telah terlihat dalam gel poliakrilamid tersebut.

Analisis terhadap profil protein yang muncul pada gel poliakrilamid hasil elektro-

foresis SDS-PAGE dilakukan dengan mengidentifikasi BM pada pita-pita protein yang terbentuk pada masing-masing sampel, kemudian dibandingkan dengan standar dari marker protein. Penentuan nilai-nilai BM pada pita-pita protein dalam sampel dilakukan dengan menggunakan grafik kalibrasi berat molekul. Hal tersebut dilakukan dengan menentukan jarak migrasi sampel atau nilai *Retardation Factor* (Rf). Nilai Rf dari masing-masing pita yang muncul pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE, dihitung dengan rumus: Rf sama dengan jarak pergerakan protein dari tempat awal/ jarak pergerakan warna dari tempat awal (Rantam, 2003).

Nilai Rf yang telah diperoleh kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi linier $y = ax + b$, dengan y adalah nilai berat molekul dan x adalah nilai Rf sampel. Interpretasi dari profil protein pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE dapat dibaca dengan membuat persamaan regresi linier dari pita-pita protein yang terdapat di dalam marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*. Pita-pita protein tersebut digunakan sebagai standar acuan penentuan BM pita protein dalam sampel-sampel lainnya. Jika persamaan regresi linier menghasilkan R^2 yang nilainya semakin mendekati 1, maka persamaan regresi linier yang diperoleh semakin bagus. Semakin mendekati 1 menunjukkan bahwa persamaan tersebut mendekati kepastian nilai berat molekul dari protein yang dianalisis.

HASIL

Keadaan Hewan Uji dan Sampel Darah

Mus musculus strain DDY yang telah diaklimatisasi selama 2 minggu, berhasil diambil sebanyak 20 ekor yang bagus kondisi kesehatannya untuk digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian ini. *M. musculus* pada kelompok K, D1, D2, dan D3 berhasil diberikan sedian uji secara *per-oral* selama 7 hari berturut-turut dan dalam keadaan kesehatan yang baik, serta tidak terjadi cedera fisik. Pengambilan sampel darah berhasil dilakukan pada hari ke-8. Darah berhasil diambil dari area pleksus *venosus retro-orbitalis* mata *M. musculus* dengan menggunakan pipa hematokrit. *M. musculus* tetap dalam keadaan hidup

tanpa cacat pada mata setelah dilakukannya pengambilan darah. Darah yang diperoleh kemudian ditampung dalam tabung Eppendorf steril dan disentrifugasi sehingga diperoleh serum yang dapat digunakan sebagai sampel untuk pengukuran berat molekul protein di dalamnya.

Kadar Protein dari Ekstrak Protein Biji *N. sativa*

Ekstrak protein biji *N. sativa* yang diperoleh dari proses pengendapan amonium sulfat

dan dialisis dengan kantong dialisa berpori 3500 MW (BM 3,5 kDa) telah memungkinkan untuk dilakukannya analisis protein defensin (Ns-D1/Ns-D2) yang memiliki BM 5,4763 kDa dan 5,4924 kDa. Konsentrasi yang digunakan dalam kurva standar adalah dari 0 sampai 100 µg/ml dengan variasi serial konsentrasi 0, 12,5, 25, 50 dan 100 µg/ml dan diperoleh nilai absorbansi hasil analisis kadar protein pada kurva standar (Tabel 1).

Tabel 1. Nilai absorbansi konsentrasi larutan BSA (sebagai standar)

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Rata-rata
	i	ii	iii	
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
12,5	0,0916	0,0916	0,0916	0,0916
25	0,1955	0,1955	0,1946	0,1952
50	0,3588	0,3587	0,3595	0,3590
100	0,6333	0,6334	0,6335	0,6333

Tabel 2. Nilai absorbansi sampel ekstrak protein biji *N. sativa*

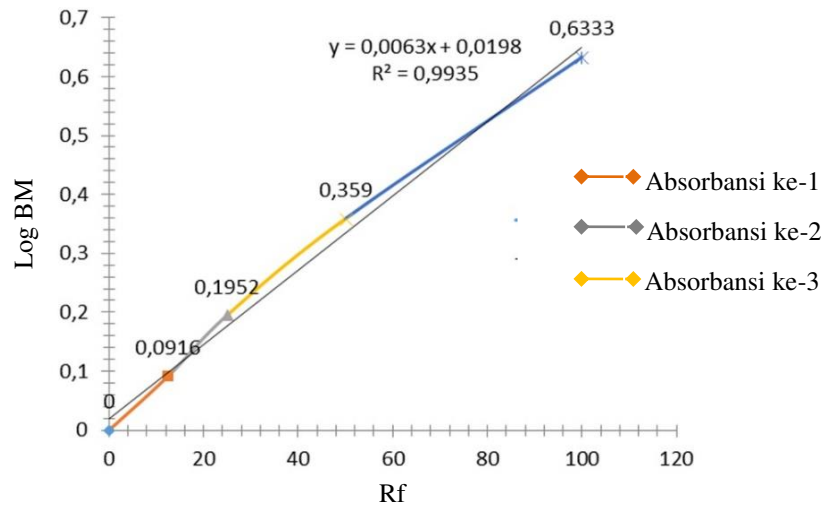
Absorbansi sampel (y)	$Y = 0,006x + 0,019$	mg/ml x faktor pengenceran (x)	mg/g	Kadar % g/g
0,334	52,50	0,0525	480,00	48,31
0,338	53,17	0,0532	486,10	

Hasil dari penghitungan pada tabel larutan standar dibuat kurva regresi dengan nilai konsentrasi sebagai x dan nilai absorbansi sebagai y . Hasil pengukuran konsentrasi kontrol anabsorbansi standar dimasukkan ke dalam persamaan linier sehingga diperoleh kurva standar protein. Berdasarkan perhitungan tersebut, maka diperoleh persamaan linier $y = 0,063x + 0,0198$. Kurva dari persamaan linier tersebut memperlihatkan slop positif dengan kontrol garis yang mendekati 1 yaitu $R = 0,9935$ (Gambar 1). Hasil penghitungan kadar protein dalam sampel ekstrak protein biji *N. sativa* berdasarkan persamaan linier dan kurva kalibrasi dari standar, menunjukkan bahwa kadar protein di dalam sampel ekstrak protein biji *N. sativa* yang diberikan pada *M. musculus* adalah sebesar 48,31 g/ml (Tabel 2).

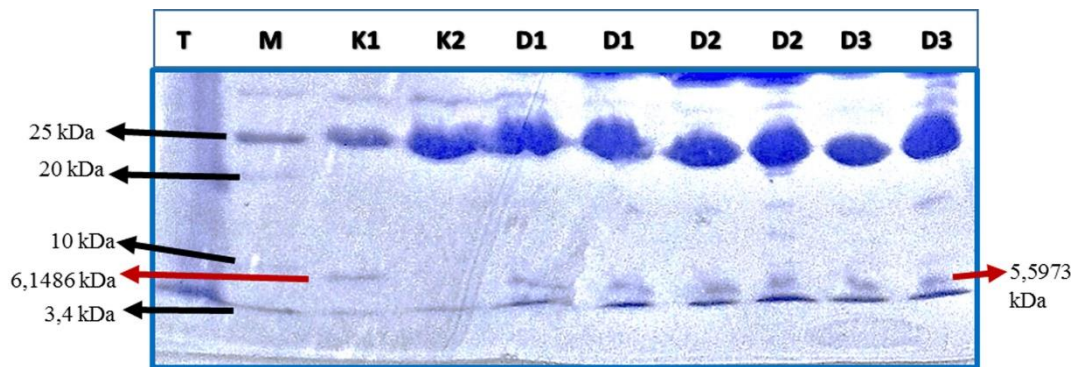
Analisis Profil Defensin

Hasil elektroforesis SDS-PAGE pada gel poliakrilamid 17% memperlihatkan adanya pita-pita protein yang terdapat pada masing-masing sumuran. Pada sumuran M terdapat pita-pita protein marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*. Pada sumuran T terdapat pita protein dari sampel ekstrak protein biji *N. sativa*. Pada sumuran K terdapat pita protein dari sampel darah *M. musculus* kontrol. Pada sumuran D1 terdapat pita protein dari sampel darah *M. musculus* diberikan ekstrak protein biji *N. sativa* dosis rendah. Pada sumuran D2 terdapat pita protein dari sampel darah *M. musculus* yang diberikan ekstrak protein biji *N. sativa* dosis sedang. Pada sumuran D3 terdapat pita protein dari sampel darah *M. musculus* yang diberikan ekstrak protein biji *N. sativa* dosis tinggi. Marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder* dan sampel diletakkan dalam 10

sumuran, dengan urutan T, M, K1, K2, D1, D1, D2, D2, D3 dan D3 (Gambar 2).



Gambar 1. Nilai kalibrasi standar



Gambar 2. Profil SDS-PAGE dari sampel T, M, K1, K2, D1, D2 dan D3

Tabel 3. Nilai Rf terhadap log BM pita standar *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*

BM Marker	Migrasi gel (cm)	Jarak pita (cm)	Nilai Rf (x)	Log BM (Y)
100	4,9	0,75	0,15	2,00
30	4,9	1,10	0,22	1,48
25	4,9	1,60	0,33	1,40
20	4,9	2,50	0,51	1,30
15	4,9	2,95	0,60	1,18
10	4,9	3,30	0,67	1,00
5	4,9	4,25	0,87	0,70
3,4	4,9	4,70	0,96	0,53

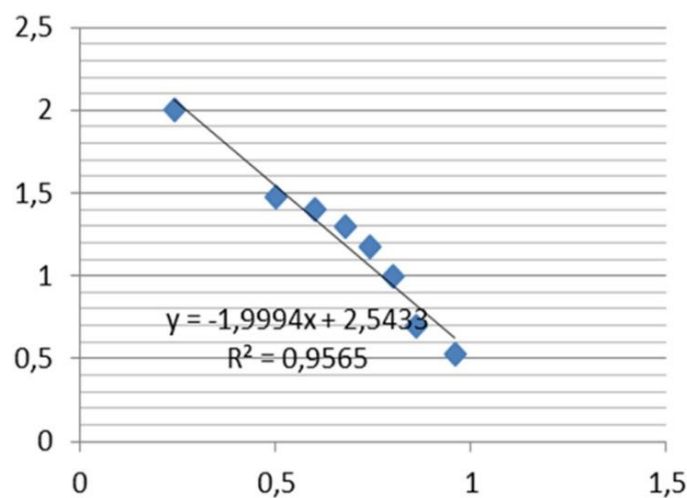
Pada gel poliakrilamid 17% hasil SDS-PAGE terdapat pita-pita protein yang dapat dihitung berat molekulnya. Penentuan berat molekul terhadap profil defensin pada tiap sampel difokuskan pada pita-pita yang berat molekulnya berada di bawah 25 kDa. Pita

protein dengan BM 25 kDa pada hasil elektroforesis SDS-PAGE dalam gel poliakrilamid 17% memperlihatkan intensitas warna yang paling jelas dan paling tebal, sehingga dapat digunakan sebagai acuan bagi sampel yang memiliki BM di bawah 25 kDa. Selain itu,

defensin Ns-D1 dan Ns-D2 yang memiliki BM 5,4763 kDa dan BM 5,4924 kDa akan muncul di antara pita yang berukuran BM 3,4 kDa–10 kDa. Pita-pita protein dengan BM di bawah 25 kDa berada pada urutan ke-1 sampai ke-3 dari bawah. Berdasarkan keadaan tersebut maka diperoleh 4 (empat) pita yang digunakan untuk menentukan BM protein pada tiap sampel. Berat molekul protein yang terlihat pada setiap jalur sampel ditentukan melalui nilai Rf dari masing-masing pita protein. Selanjutnya nilai Rf dimasukkan dalam persamaan regresi linear $y = ax + b$, dengan y adalah berat molekul, dan x adalah nilai Rf sampel. Nilai Rf terhadap log

BM pita protein pada marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder* sebagai standar dapat dihitung dan tersaji dalam Tabel 3.

Nilai Rf terhadap log BM marker kemudian digunakan dalam pembuatan grafik (kurva) nilai log BM, penentuan persamaan linier, dan penentuan nilai korelasi R. Hasil perhitungan Rf dan log BM pada pita-pita marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder* pada gel poliakrilamid 17% hasil SDS-PAGE menghasilkan persamaan regresi linier: $y = -1,999x + 2,543$ dengan korelasi $R = 0,9565$ (Gambar 3)



Gambar 3. Nilai Log BM Pita Marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*

Penghitungan BM terhadap pita-pita protein yang muncul pada sampel T, K, D1, D2, dan D3 yang muncul pada gel poliakrilamid 17% hasil SDS-PAGE menghasilkan nilai Rf dan log BM pada masing-masing sampel tersebut (Tabel 4). Hasil analisis terhadap pita-pita yang muncul pada gel poliakrilamid 17% menunjukkan bahwa pada sampel T terdapat pita *smear* yang berada di antara 3,4 kDa–10 kDa. Pada sampel K1 dijumpai pita dengan BM di atas 6 kDa yaitu BM 6,1486 kDa, sedangkan pada sampel K2 tidak muncul pita tersebut. Hasil penghitungan terhadap log BM, diperoleh pita protein dengan BM 5,5973 kDa pada sampel D1, D2 dan D3. (Tabel 4). Berat molekul pada sampel D1, D2 dan D3 sangat mendekati BM dari defensin Ns-D1/Ns-D2 pada 5,4763 kDa/ 5,4924 kD.

PEMBAHASAN

Pada sampel T, K, D1, D2 dan D3 hasil SDS-PAGE yang menggunakan gel poliakrilamid 17% memperlihatkan adanya pita-pita protein dengan ketebalan yang berbeda. Tebal dan tipisnya pita-pita protein yang terlihat pada gel poliakrilamid merupakan gambaran dari banyaknya protein yang terkandung dalam berat molekul suatu protein. Pada penelitian Gunanti (2010) menjelaskan bahwa tebal dan tipisnya pita protein pada hasil SDS-PAGE disebabkan karena terdapat perbedaan secara genetik antara protein tersebut. Tebal dan tipisnya pita-pita protein pada gel yang berisi sampel serum juga dapat dikarenakan perbedaan konsentrasi protein dalam sampel serum darah. Schägger (2006), memberikan alternatif jika pita protein yang

muncul pada gel poliakrilamid terlihat tipis dikarenakan protein yang dianalisis memiliki BM kurang dari 20 kDa, perlu menggunakan teknik elektroforesis *Tris-Tricine*-SDS-PAGE. Teknik tersebut memungkinkan untuk terjadinya pemisahan yang optimal pada protein dengan BM rendah. Analisis terhadap pita-pita protein yang terlihat samar (*smear*) pada

sampel T menunjukkan adanya protein BM 3,4 kDa–10 kDa yaitu pada BM 5,3405 kDa. Pita protein pada sampel T yang masih terlihat samar, menunjukkan masih perlu dilakukannya pemurnian lebih lanjut untuk mendeteksi keberadaan defensin *N. sativa* Ns-D1 dan Ns-D2 yang memiliki BM 5,4763 kDa dan 5,4924 kDa.

Tabel 4. Nilai BM pada Sampel T, K, D1, D2 dan D3

Sampel	Urutan pita dari bawah	Jarak (cm)	Rf (x)	Log BM (y)	antilog y = BM (kDa)
T	pita ke-4	2,80	0,5714	1,4007	25,1602
	pita ke-3	3,35	0,6837	1,1763	15,0085
	pita ke-2	4,45	0,9082	0,7276	5,3405
	pita ke-1	4,90	1,0000	0,5440	3,4995
K	pita ke-4	2,8	0,5714	1,4007	25,1602
	pita ke-3	3,35	0,6837	1,1763	15,0085
	pita ke-2	4,30	0,8776	0,7888	6,1486
	pita ke-1	sangat tipis			
D1	pita ke-4	2,80	0,5714	1,4007	25,1602
	pita ke-3	3,35	0,6837	1,1763	15,0085
	pita ke-2	4,40	0,8980	0,7480	5,5973
	pita ke-1	4,90	1,0000	0,5440	3,4995
D2	pita ke-4	2,80	0,5714	1,4007	25,1602
	pita ke-3	3,35	0,6837	1,1763	15,0085
	pita ke-2	4,40	0,8980	0,7480	5,5973
	pita ke -1	4,90	1,0000	0,5440	3,4995
D3	pita ke-4	2,80	0,5714	1,4007	25,1602
	pita ke-3	3,35	0,6837	1,1763	15,0085
	pita ke-2	4,40	0,8980	0,7480	5,5973
	pita ke-1	4,90	1,0000	0,5440	3,4995

Penentuan kadar protein pada ekstrak protein biji *N. sativa* dilakukan dengan metode Lowry. Pembuatan larutan standar dengan berbagai variasi konsentrasi bertujuan untuk menentukan kadar protein dalam suatu sampel. Pengukuran kadar protein dalam sampel ekstrak protein biji *N. sativa* yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode Lowry didasarkan pada kestabilan ikatan protein dengan protein Lowry sehingga absorbansi yang terbaca akan relatif stabil. Alasan lainnya adalah karena interferensi zat lain menjadi lebih kecil disebabkan hanya protein yang berikatan dengan protein Lowry. Keunggulan lainnya adalah dalam pengukuran

yang lebih sensitif. Mickelson dan Corton (2004) menyatakan keunggulan metode Lowry karena pengukuran lebih sensitif (1µg hingga 100µg) sehingga diperoleh data yang lebih valid. Berdasarkan pertimbangan bahwa jumlah sampel protein harus dengan penanganan yang lebih stabil, maka dipilih metode Lowry.

Pemilihan *M. musculus* sebagai hewan uji dalam penelitian ini dengan mempertimbangkan kemudahan dalam mendapatkannya dan kemudahan dalam pemeliharaan serta penanganannya. Malole dan Pramono (1989) menyatakan bahwa *M. musculus* adalah hewan uji yang paling kecil di antara berbagai jenis hewan uji dan memiliki banyak galur

(strain). Karakteristik yang menjadikan *M. musculus* banyak digunakan sebagai hewan uji (khususnya dalam penelitian biologi) adalah karena *M. musculus* memiliki siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, memiliki variasi sifat yang tinggi, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksinya mirip dengan mamalia lainnya, dan dapat hidup mencapai umur 1-3 tahun, meskipun terdapat perbedaan usia dari berbagai galur terutama berdasarkan kepekaan terhadap lingkungan dan penyakit. Pemilihan strain DDY dengan memperhatikan karakternya sebagai hewan uji dan kepentingan pengujian bahwa *M. musculus* strain DDY dikembangkan di laboratorium Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi dan Obat Hewan (BBPMSOH) sejak tahun 1985, dan telah dikenal sangat baik dalam reproduksi maupun dalam pertumbuhannya yang superior.

Pemberian ekstrak protein biji *N. sativa* ke dalam tubuh *M. musculus* dilakukan secara *per-oral* dengan mempertimbangkan bahwa jalur pemberian obat berbahan *N. sativa* sebagian besar melalui rute *per-oral*. Selain itu, cara *per-oral* merupakan cara pemberian sediaan uji yang mudah, aman, dan murah. Kehati-hatian dalam pemberian sediaan uji kepada *M. musculus* adalah untuk menghindari terjadinya cedera yang mempengaruhi kesehatan hewan uji. Mekanisme pemberian sediaan uji secara *per-oral* yang keliru dapat menyebabkan masuknya sediaan uji ke dalam saluran pernapasan atau paru-paru sehingga dapat berakibat terjadinya gangguan pernapasan dan kematian. Sampel darah *M. musculus* diambil melalui pleksus *venosus retro-orbitalis* mata dengan mempertimbangkan volume serum yang diperlukan untuk analisis. Perubahan tempat pengambilan sampel darah dapat mengakibatkan adanya perubahan nilai kimiawi dari serum. Beberapa metode pengambilan darah pada hewan uji terlihat cukup sederhana untuk dilakukan, namun perlu keterampilan tersendiri. Cara khusus diperlukan agar dapat menangani hewan uji dan menguasai metode pengambilan darah dari mata *M. musculus*. Pemilihan darah sebagai jaringan tubuh yang diamati secara *in vivo* berdasarkan tujuan penelitian untuk melihat keberadaan defensin dari ekstrak

protein biji *N. sativa* dalam sistem sirkulasi tubuh.

Analisis terhadap pita-pita protein yang muncul pada gel poliakrilamid 17% dalam sampel serum darah K1 dijumpai adanya pita protein dengan BM 6,1486 kDa (BM di atas 6 kDa), sedangkan pada K2 tidak muncul pita tersebut. Munculnya pita dengan BM di atas 6 kDa pada sampel K1 serta tidak munculnya pita tersebut pada K2 memungkinkan sebagai konfirmasi bahwa dalam darah *M. musculus* yang tidak diberi ekstrak protein biji *N. sativa* tidak terdapat protein defensin Ns-D1/Ns-D2, berdasarkan Rogozhin *et al.*, (2011) bahwa protein defensin Ns-D1 dan Ns-D2 memiliki BM kurang dari 6 kDa. Munculnya pita protein pada sampel T dapat diharapkan sebagai konfirmasi bagi keberadaan defensin *N. sativa* Ns-D1/Ns-D2. Namun demikian masih perlu dilakukan konfirmasi BM pada masing-masing pita protein tersebut dengan melalui teknik analisis yang lebih akurat, seperti teknik *Tris-Tricine* SDS-PAGE. Keberadaan pita-pita protein yang telah dianalisis melalui penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi bagi penelitian selanjutnya, sebagai konfirmasi keberadaan suatu protein yang diperoleh dari ekstraksi suatu tanaman pangan/herba berkhasiat yang diujikan secara *in vivo*.

KESIMPULAN

Pada ekstrak protein biji *N. sativa* terdapat pita protein dengan BM 3,4-10 kDa dan pada *M. musculus* yang diberi ekstrak protein biji *N. sativa* terdapat pita protein dengan BM 5,5973 kDa. Munculnya pita protein dengan BM kurang dari 6 kDa ini menunjukkan adanya defensin (Ns-D1/Ns-D2) dari ekstrak protein biji *N. sativa* di dalam darah *M. musculus*.

SARAN

Perlu dilakukan analisis profil defensin dengan menggunakan teknik elektroforesis *Tris-Tricine* SDS-PAGE.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian UIN Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah mendanai penelitian ini, Pusat Laboratorium

Terpadu (PLT) UIN Syarif Hidayatullah Jakarta dan Prodi Biologi FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta untuk fasilitas dan dukungan dalam penelitian.

REFERENSI

- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., Damanhour, Z.A., & Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337-352. doi: 10.1016/s2221-1691(13)60075-1.
- Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach, E., Almeida, F. C., & Valente, A. P. (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, Identical backbone with different mechanisms of Action. *Journal Molecular Biology*, 315(4), 749-757. doi:10.1006/jmbi.2001. 5252.
- Bintang, M. (2010). *Biokimia teknik penelitian*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Coligan J. E. (1996). *Current protocols in protein science*. John Wiley & Sons, Inc. Unit 4.7.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas S., Widyarti, & Rahayu, S. (2011). *Biologi molekuler prinsip dasar analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Frokjaer, S., & Hovgaard, I. (2003). *Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins*. Philadelphia: Taylor & Francis Inc.
- Gilani, A. H., Jabeen, Q., & Khan, M. A. U. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan J. of Biological Sciences Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(4), 441-451. doi: 10.3923/ pjbs. 2004. 441.451.
- Gray, J. D. (2010). *Rasulullah is my doctor*, penyunting Ivan Satria, cetakan 1. Jakarta: Sinergi Publishing.
- Gunanti, M., Ulia, F., Sri, D. (2010). Karakterisasi protein *Larrea cyprinacea* dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 2(1), 61-66.
- Hames, B.D., & Rickwood. (1990). *A practical approach: Gel electrophoresis protein*. Huntington: Robert E Krieger Publishing Company.
- Haq A., Lobo P. I., Al-Tufail M., Rama, N. R., & Al-Sedairy, S. T. (1999). Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International Journal of Immuno-pharmacology*, 21(4), 283-295. doi: 10.1016/s0192-0561 (99) 00010-7.
- Janson, J. C., & Ryden, L. (1998). *Protein purification principles, high-resolution methods and applications*, Second Edition. Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Janssen B. J. C., Schirra H. J., Lay F. T., Anderson M. A., & Craik D. J. (2003). Structure of petunia hybrida defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*, 42(27), 8214-8222. doi: 10.1021/bi034379o.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, International Weekly Journal of Science*, 227(5259), 680-685. doi: 10.1038/227680a0.
- Malole, M. B. M., & Pramono, C. S. U. (1989). *Penggunaan hewan-hewan percobaan di laboratorium*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi dan Kebudayaan, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB.
- Mickelson, R., & Eduardo Corton. (2004). *Bioanalytical chemistry*, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Rantam, F. A. (2003). *Metode imunologi*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Rogozhin, E. A., Oshchepkova, Y. I., Odintsova, T. I., Khadeeva, N. V., Veshkurova, O. N., Egorov, T. A., & Salikhov, S. I. (2011). Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(2), 131-137. doi:10.1016/j.plaphy. 200.10.008.

- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. doi: 10.1038/nprot.2006.4.
- Stryer, L. (1995). *Biokimia*. penerjemah; Soebianto S, editor. Terjemahan dari: *Biochemistry*. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.